



---

**Universidad de Valladolid**

**Facultad de Medicina**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

FACULTAD DE MEDICINA: Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular y Fisiología

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Estudio fisiopatológico de la cepa DDP1 de *C. elegans*  
(Enfermedad de Parkinson)**

**SARA RUIZ SERRANO**

Tutoras: Dra. Pilar Álvarez-Illera

Dra. Mayte Montero Zoccola

### Abreviaturas y siglas:

CGC	Caenorhabditis Genetics Center
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
D1	Día 1 adulto
D5	Día 5 adulto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
<i>E. Coli</i> OP50	Cepa de <i>Escherichia coli</i>
EFG	Electrofaringeograma
FuDR	5-fluoro-2'-desoxiuridina
L1	Estadio larvario 1
L2	Estadio larvario 2
L3	Estadio larvario 3
L4	Estadio larvario 4
MAO-B	Monoamino oxidasa-B
OP50	Escherichia Coli
RNAi	RNA de interferencia
Sca-1	<u>S</u> arco endoplasmic <u>c</u> alcium <u>A</u> TPase

### Palabras clave:

*Caenorhabditis elegans*, electrofaringeograma, enfermedad de Parkinson, DDP1, DDP2.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>Pág</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>3</b>
1.1 Enfermedad del Parkinson.....	3
1.1.1 Etiología de la enfermedad del Parkinson.....	3
1.1.2 Alfa-sinucleína.....	4
1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	4
1.2.1 Modelo para investigación.....	4
1.2.2 Ciclo de vida y desarrollo.....	5
1.2.3 Sistema muscular.....	6
1.2.4 Sistema nervioso.....	7
1.2.5 Faringe.....	7
1.2.6 RNA de interferencia.....	8
1.3 Hipótesis.....	8
1.4 Objetivos.....	8
<b>2. Material y métodos.....</b>	<b>9</b>
2.1 Cepas.....	9
2.2 Mantenimiento.....	9
2.3 Preparación de las placas de agar.....	9
2.4 Preparación de las placas de agar con FuDR.....	10
2.5 Preparación placas RNAi.....	10
2.6 Obtención de huevos para su sincronización .....	11
2.7 Puesta de huevos y fertilidad.....	11
2.8 Curvas de mortalidad.....	12
2.9 Electrofaringeograma.....	12
<b>3. Resultados.....</b>	<b>14</b>
3.1 Estudios de fertilidad.....	14
3.2 Estudios de mortalidad.....	14
3.3 Electrofaringeograma.....	15
3.4 Estudio de la esperanza de vida en gusanos DDP1 con sca-1 10%. 16	
<b>4. Discusión.....</b>	<b>17</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>18</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>19</b>

## **Anexos**

## Resumen

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por pérdida de neuronas dopaminérgicas y agregación de alfa-sinucleína. Esta neurodegeneración se asocia con alteraciones químicas de dopamina, tráfico vesicular anormal, homeostasis de proteínas y envejecimiento, además posee gran carga social concomitante. En los seres humanos los factores de riesgo genéticos de la enfermedad de Parkinson se han relacionado con los loci genéticos PARK: la proteína alfa-sinucleína, la proteína de tráfico vesicular VPS35, la quinasa multidominio LRRK2 Parkin y DJ-1. El nematodo *C. elegans* se ha utilizado como modelo experimental de enfermedades neurodegenerativas. El genoma de *C. elegans* codifica homólogos genéticos de la mayoría de estos factores de riesgo, con excepción de alfa-sinucleína. En este trabajo experimental básico se ha utilizado la cepa DDP1, que sobre-expresa alfa-sinucleína humana en *C. elegans*, induciendo neurodegeneración progresiva dependiente del tiempo y progresión del defecto motor, por plegamiento incorrecto de alfa-sinucleína y agregándose e induciendo toxicidad con la edad. En el presente trabajo se ha estudiado la fertilidad, la esperanza de vida, la actuación del RNAi de *sca-1* sobre la expresión de alfa-sinucleína y posibles alteraciones en el bombeo de la faringe del gusano DDP1 con EFG. Los resultados obtenidos muestran que la cepa DDP1 tiene una esperanza de vida menor que los controles. Cuando los DDP1 son tratados con RNAi *sca-1* se revierte y presentan una esperanza de vida un 10% mayor, hecho que iguala a la de los DDP2 control. Respecto a los otros parámetros estudiados no se aprecian diferencias significativas con los controles.

# 1. Introducción

## 1.1 Enfermedad de Parkinson

### 1.1.1 Etiología de la enfermedad

Esta enfermedad es el trastorno neurodegenerativo, en relación con la edad, más prevalente después de la enfermedad del Alzheimer, afectando a 10 millones de personas en todo el mundo, con una edad media de aparición alrededor de los 60 años. (1)

La enfermedad de Parkinson, es bien conocida, destaca por empeorar progresivamente con la edad, clasificándose dentro de los trastornos neurodegenerativos y caracterizada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas particularmente en la sustancia negra y la agregación de alfa-sinucleína intracelular, histológicamente denominada cuerpo de Lewy. (2)

Clínicamente se caracteriza por alteraciones motoras como la rigidez, el temblor, el desequilibrio postural o la lentitud en los movimientos y por otras funciones no motoras como ansiedad, pérdida de memoria, depresión y déficits olfatorios. Estos síntomas son resultado de la reducción de dopamina que provoca un desequilibrio en la señalización motora en el putamen y el globo pálido.

Su etiología hoy en día no está aclarada, aunque se han propuesto causas como mutaciones genéticas y factores ambientales. La neurodegeneración se produce a causa del estrés celular de la agregación de alfa-sinucleína tóxica y la disfunción mitocondrial, como consecuencia de mutaciones heredadas. (3)

Su diagnóstico es clínico y se basa en la evidencia de parkinsonismo, con datos de apoyo como: el inicio asimétrico, la respuesta a L-dopa, los síntomas no motores, y por último que no presente datos de exclusión como por ejemplo paresia, afección piramidal o signos cerebelosos. (4)

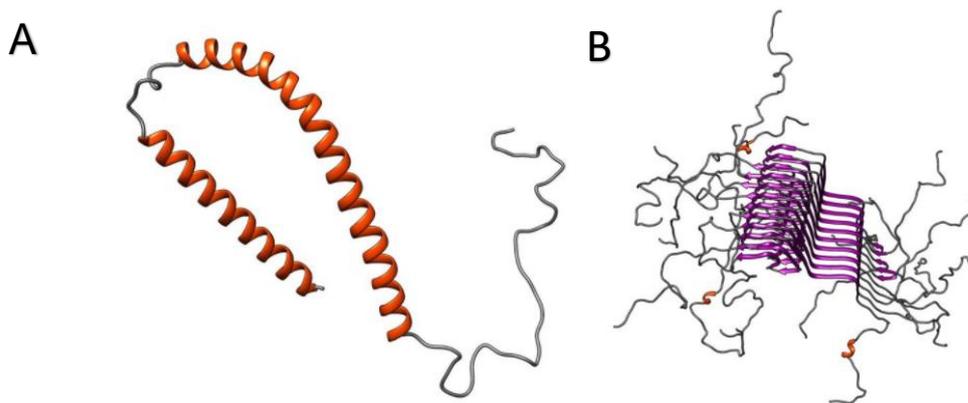
En cuanto a su tratamiento sintomático, está basado en el uso de L-DOPA, agonista de la dopamina o inhibidores de monoamino oxidasa-B (MAO-B). Pero las causas fundamentales de la enfermedad no se conocen y siguen siendo incurables. Por ello es necesario realizar estudios experimentales básicos para entender los mecanismos moleculares de la enfermedad.

### 1.1.2 Alfa-sinucleína

La alfa-sinucleína es una proteína citoplasmática en mayor porcentaje presináptica, muy soluble, pequeña y compuesta por 140 aminoácidos con tres dominios, siendo importante para el almacenamiento, la compartimentación y el reciclaje de neurotransmisores. En los seres humanos se encuentra en gran medida en el cerebro y en menor presencia en corazón y músculo entre otros. (2)

El organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) es un nematodo que no tiene un homólogo de la alfa-sinucleína, por lo que para estudiar su sobreexpresión y agregación en la enfermedad de Parkinson se han creado varias cepas transgénicas de *C. elegans*, que expresan alfa-sinucleína humana, entre las que se encuentra la DDP1, cepa utilizada en el presente trabajo.(5)

En la cepa DDP1 el gen de la alfa-sinucleína humana se expresa en las células musculares de la pared corporal y en neuronas, dando como resultado la neurodegeneración dependiente de la edad. (6)



**Figura 1:** A: alfa-sinucleína normal y B: agregada, visualizadas con NGL viewer. (Genética médica news, 2018).

## 1.2 **Caenorhabditis elegans**

### 1.2.1 Modelo para investigación

El *C. elegans* es un importante modelo animal usado en estudios de neurobiología o genética ya que posee un 40% de genes, proteínas y vías homologas al ser humano.

Su aportación al conocimiento científico se consolidó a partir de 1998, cuando se secuenció completamente su genoma y la metodología utilizada se aplicó posteriormente a la secuenciación del genoma humano.

El *C. elegans*, es un organismo modelo no mamífero e invertebrado útil para comprender los mecanismos moleculares de distintas enfermedades como la enfermedad de Parkinson, así como el estudio del envejecimiento neuronal y síntomas celulares de esta enfermedad.

El *C. elegans* comparte muchos mecanismos y vías celulares conservados en mamíferos, incluidos también los humanos. Este nematodo hermafrodita en estadio adulto posee 959 células somáticas, de las cuales 302 neuronas que pertenecen a dos sistemas nerviosos distintos e independientes, por un lado, un gran sistema nervioso somático con 282 neuronas, y por otro lado, un pequeño sistema nervioso faríngeo con 20 neuronas.

La importancia del *C. elegans* para la investigación se basa en: su corto tiempo de vida (unas 2-3 semanas), su tamaño de 1 milímetro de longitud y el ser transparente lo que facilita los experimentos de fluorescencia y luminiscencia. Su mantenimiento es a 20°C, en un ambiente no estéril, puesto que el gusano crece en la tierra. Presentan dimorfismo sexual: 99% hermafroditas y 1% machos. Tiene una elevada progenie, 200-300 huevos, permitiendo su producción a gran escala en periodos cortos de tiempo. El gusano una vez alcanza el estadio adulto tiene 959 células que no van a sufrir más divisiones celulares, exceptuando los huevos que inician su división en el interior de la madre. Además, se pueden interrumpir genes específicos fácilmente con RNA de interferencia, que silencia específicamente un determinado gen.

La cepa control de referencia es la cepa salvaje N2, que se utilizó por primera vez en 1964 por Sydney Brenner (Premio Nobel en Medicina, 2002). A partir de ella se han obtenido múltiples líneas mutantes para diversos estudios y la mayoría de estos nematodos mutantes están en el repositorio del Caenorhabditis Genetics Center (CGC, University Minnesota, USA), centro que se encarga de almacenaje y distribución de los mutantes a los laboratorios de investigación .

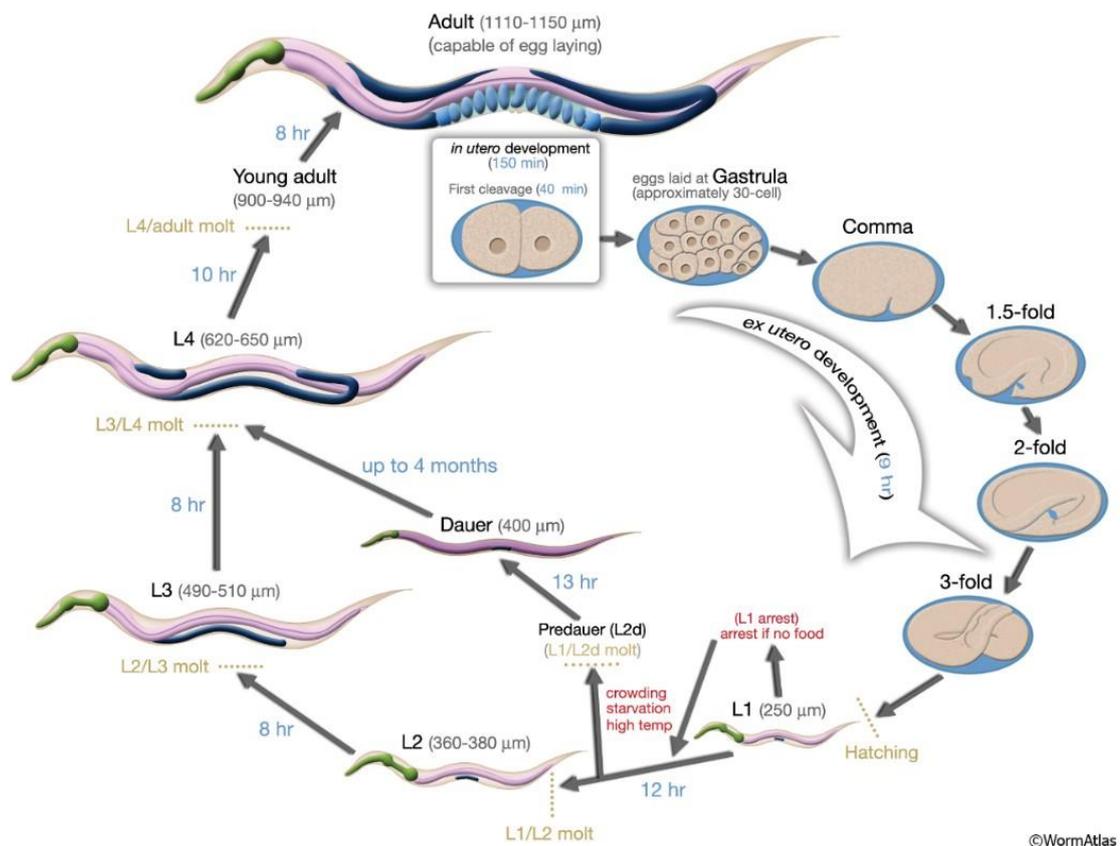
### 1.2.2 Ciclo de vida y desarrollo

El desarrollo post-embrionario dura 3 días. El gusano va pasando por distintos estadios larvarios desde que el huevo eclosiona hasta que llega a adulto, siendo cada estadio fácilmente reconocible por unas características determinadas:

- Estadio L1: tamaño tan pequeño que no se pueden reconocer sus órganos y poseen un número pequeño de células.
- Estadio L2: mayor tamaño que L1 y mayor complejidad interna.

- Estadio L3: tamaño notablemente mayor y alta diferenciación de sus estructuras internas.
- Estadio L4: mayor tamaño ( $\approx 100\mu\text{m}$ ) y forma de media luna en la mitad del cuerpo.
- Estadio adulto: tamaño 1 mm y se observan todos los órganos.

Al cambiar de un estadio a otro, pasan por un pequeño periodo de inactividad seguido del cambio de su cutícula. (Ver figura 2).



**Figura 2:** Representación de las diferentes fases del desarrollo y del ciclo de la vida de *C. elegans*. Los números azules que se sitúan sobre las flechas nos indican el tiempo que el gusano está en un estadio antes de pasar al siguiente. (Altun & Hall, 2009)

### 1.2.3 Sistema muscular

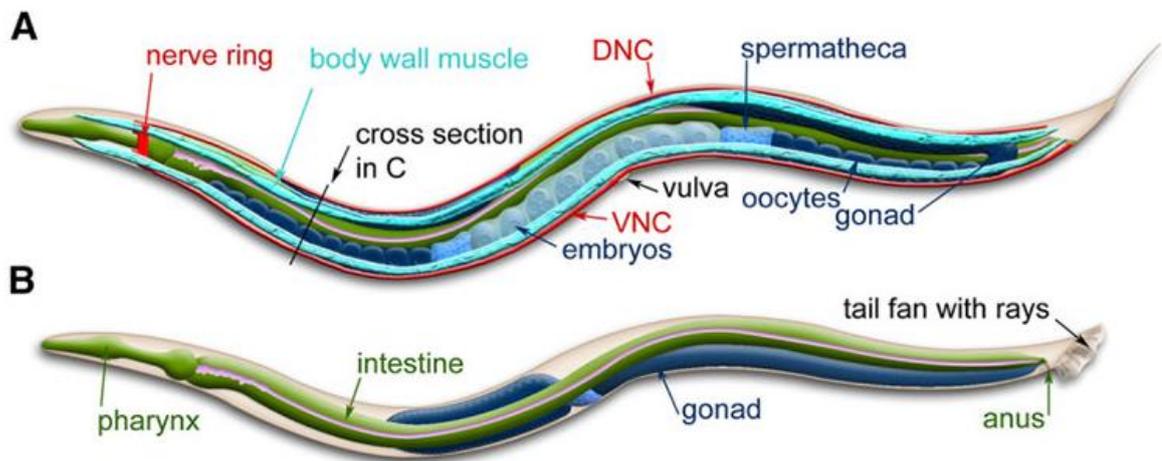
Los tejidos de *C. elegans*, a pesar de su simplicidad están bien definidos. Constan de una capa externa, la epidermis, y debajo unas bandas de músculo somático estriado que constituyen los músculos de la pared del cuerpo del gusano. Además de esos músculos poseen los faríngeos, los intestinales, los vulvares, los uterinos y la vaina de la gónada contráctil cuya función es poner huevos.

### 1.2.4 Sistema nervioso

Los cuerpos celulares de las 302 neuronas se encuentran en los ganglios de la cabeza, en el cordón ventral y la cola.

Gran parte de las neuronas poseen una estructura simple con dos neuritas que salen del cuerpo ciliar, formando sinapsis entre sí.

Hay que tener en cuenta que estas neuronas señalizan correctamente, pero carecen de canales sodio voltaje dependientes, pero se han caracterizado corrientes de potasio y de calcio sensibles a voltaje.



**Figura 3:** Anatomía de *C. elegans*. Principales características anatómicas de un hermafrodita (A) y un macho (B) vistos en una proyección lateral. (modificado de Corsi et al. Oxford instruments)

### 1.2.5 Faringe

La faringe es un órgano neuromuscular tubular que va desde la boca al intestino y consta de tres unidades funcionales corpus, istmo y bulbo terminal. La primera, el corpus, consta del procorpus y metacarpus y empieza en la boca, donde filtra las bacterias del entorno y las bombea hasta el istmo, por donde pasan las bacterias hasta llegar al bulbo terminal, donde son trituradas y acaban en el intestino.

El estudio de la faringe es importante ya que en ella se encuentran 20 de las 302 neuronas que posee el nematodo, gracias a su estudio podremos observar como se afectan las neuronas a través del electrofaringeograma (EFG).

Las motoneuronas faríngeas responsables de los movimientos para que se pueda alimentar el gusano son M3, MC y M4. Los movimientos que puede realizar la faringe son: el bombeo faríngeo y la peristalsis del istmo, consistiendo el bombeo en una contracción muscular y una relajación del corpus, del istmo anterior y del bulbo terminal.

Estos mecanismos de contracción de la faringe pueden ser asemejados a los que encontramos en los corazones de vertebrados e invertebrados, la faringe bombea durante toda la vida del gusano.

### **1.2.6 RNA interferencia**

El RNA de interferencia es una molécula bicatenaria de RNA que impide la expresión de genes específicos, de forma selectiva y precisa.

En este trabajo hemos utilizado el RNAi de la proteína *sca-1*, en *C. elegans*, que se expresa en el retículo-sarco-endoplásmico de las células del gusano, con el fin de estudiar si esta proteína *sca-1* (Sarco-endo-plasmic reticulum Calcium ATPase), que transporta  $Ca^{2+}$  al interior del retículo-sarco-endoplásmico, estuviera implicada en los efectos de la agregación de alfa-sinucleína.

### **1.3 Hipótesis**

La revisión bibliográfica acerca de la enfermedad de Parkinson muestra que la neurodegeneración se produce mayoritariamente por la agregación de la alfa-sinucleína.

En este trabajo hemos utilizado la cepa DDP1 de *C. elegans*, que expresa alfa-sinucleína y su control, la cepa DDP2 que expresa un plásmido vacío. Esto nos permite estudiar la patología del Parkinson por agregación de alfa-sinucleína en este modelo animal, y es por tanto una aproximación a la fisiopatología y la esperanza de vida de la enfermedad. Además, el RNA de interferencia de *sca-1* nos permitirá relacionar el efecto de la reducción de la expresión de la proteína *sca-1* con la presencia de alfa-sinucleína agregada.

### **1.4 Objetivos**

Este trabajo tiene como objetivo general ver los efectos de la alfa-sinucleína en *C. elegans*, causante de la enfermedad de Parkinson en humanos, comparada con la cepa control DDP2, que no expresa alfa-sinucleína.

Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Estudios de fertilidad.
- Determinación de la esperanza de vida.
- Estudio del bombeo de la faringe por EFG.
- Estudio de la esperanza de vida en gusanos DDP1 con RNAi *sca-1*.

## 2. Material y métodos

Este trabajo de experimentación básico se ha realizado en el Dpto de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología de la Facultad de Medicina e IBGM.

### 2.1 Cepas

Para la realización de este trabajo se han utilizado dos líneas de *C. elegans*: DPP1, que expresa alfa-sinucleína humana y DPP2, que no la expresa, como control.

**DDP1:** Es una cepa transgénica de *C. elegans* “humanizada” que se utiliza para monitorizar la influencia de la expresión de alfa-sinucleína a lo largo de la vida del gusano.

**DDP2:** es la cepa transgénica control de la DDP1 que expresa un plásmido vacío. Las tasas de esperanza de vida y de bombeo faríngeo que posee DDP2 son similares a las de la cepa control, N2. (7)

En todos los experimentos se han utilizado gusanos hermafroditas.

### 2.2 Mantenimiento

Las condiciones ideales para el mantenimiento de las cepas de *C. elegans* son 20°C en placas de agar NGM (Nematode Growth Medium) sembradas con *E. Coli OP50*.

El *E. Coli OP50* es la bacteria de la que se alimenta el *C. elegans*, que crece en medio 2xYT.

### 2.3 Preparación de las placas de agar

- Añadimos a botellas de 500 ml.
  - 0.75 g de NaCL.
  - 4.25 g de agar.
  - 0.65 g de peptona.
- Disolvemos 250 ml de agua desionizada.
- Autoclavamos a 120°C 2 horas.
- Las dejamos a baño María a 55°C, 15 minutos como mínimo.

- En cada botella y de forma estéril añadimos en el siguiente orden:
  - 250  $\mu$ L una disolución colesterol/etanol 5 mg/mL
  - 250  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$  1M.
  - 250  $\mu$ L de  $\text{MgSO}_4$  1M.
  - 6.25 mL de tampón KPO<sup>4</sup>.
- Agitamos. Antes de que solidifique vertemos 10 mL de la mezcla que hemos realizado en cada placa de Petri de 55 mm de diámetro (placa de mantenimiento).
- Dejamos solidificar en un ambiente estéril durante 24 horas.
- Pasado ese tiempo, añadimos 250  $\mu$ L de *E. Coli OP50* de cultivo saturado en medio 2xYT en el centro de cada placa, que servirá de alimento.

## 2.4 Preparación de las placas de agar con FuDR

Para realizar los experimentos de mortalidad y los electrofaringeogramas necesitamos que los gusanos tengan la misma edad, algo difícil en una población heterogénea de gusanos, debido a su alta capacidad de reproducción. Por ello, para evitar confusiones con la progenie, utilizamos FuDR (5-fluoro-2'-desoxiuridina), inhibidor de la replicación del DNA. Es decir, conseguimos bloquear el desarrollo de huevos sin afectar a la población adulta, ya que, el FuDR bloquea la división celular, pero no afecta a las células ya divididas.

Añadimos FuDR en el agar NGM a una concentración final de 15  $\mu$ M. Vertemos 4 mL de dicha mezcla en las placas Petri (35 mm de diámetro), esperamos 24 horas para que solidifique y posteriormente sembramos con OP50 en medio 2xYT en el centro de las placas.

## 2.5 Preparación placas RNAi

- Hacemos placas de mortalidad NGM (35mm) con IPTG 1mM, Carbenicilina 50 $\mu$ M y FuDR 15 $\mu$ M.
- Picamos una colonia de *L4440i* (plásmido vacío) y otra de *sca-1* (RNAi de *sca-1*) en cada tubo y se ponen a crecer a 37°C en el agitador durante toda la noche en medio Luria Broth (LB) ampicilina 125 $\mu$ M.
- Medimos la DO<sub>595</sub> del cultivo líquido de las bacterias y lo llevamos a una DO<sub>595</sub>=0,6.
- Hacemos la dilución deseada del RNAi de interés, en nuestro caso 10% de bacterias con RNAi de *sca-1* más 90% de bacterias con *L4440i*.

- Se siembran las placas con 100µl de la mezcla de bacterias y lo dejamos 3 días a 20°C para que crezcan las bacterias.

## 2.6 Obtención de huevos para su sincronización

Para realizar los diferentes estudios es necesario que los *C. elegans* tengan los mismos días de vida, por lo que necesitamos la sincronización de los mismos.

Por ello, cogemos una placa de mantenimiento en la que tengamos alta población de gusanos adultos, y realizamos el siguiente protocolo con el fin de obtener huevos:

- Añadimos 1.6 mL de tampón M9 (Ver anexo I) en las placas con gusanos y lo recogemos en un eppendorf.
- Centrifugamos 1 minuto a 2000 r.p.m.
- Retiramos el sobrenadante a excepción de 100 µL aproximadamente.
- Añadimos:
  - 150 µL de disolución lejía/sosa 2:1 (lejía/NaOH 5M) que se prepara en el momento más 250 µL del tampón M9.
- Durante 10 minutos, cada 2 minutos, agitamos 15 segundos el eppendorf con el vórtex. Debe quedarnos una mezcla homogénea, por la rotura de los gusanos.
- Centrifugamos a 8000 r.p.m. durante 1 minuto.
- Retiramos todo el sobrenadante a excepción de 100 µL aproximadamente.
- Añadimos 1 ml de tampón M9 y agitamos hasta que haya desaparecido el precipitado con el vórtex.
- Centrifugamos a 8000 r.p.m. durante 1 minuto. Deberemos observar un sedimento.
- Retiramos todo el sobrenadante a excepción de 100 µL aproximadamente.
- Mezclamos bien y vertemos las gotas oportunas en placas de Petri sembradas previamente con *OP50*.
- Dejamos secar y, posteriormente, guardamos las placas en posición invertida dentro del incubador a 20°C.

Este tratamiento destruye los gusanos adultos con lejía y NaOH, pero no afecta a la integridad de los huevos, que se desarrollaran sincrónicamente.

## 2.7 Puesta de huevos y fertilidad

Para los estudios de fertilidad, preparamos placas de mantenimiento en las que hay sembrado *OP50* y se coloca en cada placa 1 gusano DDP1 en estadio L4. Repetimos el protocolo con los gusanos DPP2.

En el periodo de 5 días consecutivos, se cambiarán los gusanos a placas nuevas, se llevan en paralelo las dos líneas que vamos a estudiar, DDP1 y su control DDP2. Se ponen 5 placas con 1 gusano L4 en cada placa, ese individuo se va pasando diariamente a placas nuevas. Cada día contamos las larvas que han salido y lo vamos anotando en una tabla. Se mantendrán a 20°C tanto las placas que tienen gusano como las precedentes, en las que estarán los huevos.

Tras recoger los datos se analizan las medias y el error estándar.

## 2.8 Curvas de mortalidad

La gran ventaja que ofrece el gusano es su corto ciclo de vida (15-25 días). Para realizar los estudios de mortalidad se pican los gusanos el día 1 adulto (D1) de la misma cepa y los colocamos en las placas de Petri de 35 mm de diámetro con 15µM FuDR.

Para los experimentos de mortalidad ponemos 15 gusanos DPP1 o DDP2 de D1 por placa y preparamos 10 placas de mortalidad, con un total de 150 gusanos de cada cepa. Se incuban a 20°C y se cuentan con lupa todos los días hasta que muera el último. Anotaremos todo en una plantilla. Hay que tener en cuenta que, a veces, los gusanos se pueden quedar en la tapa de las placas y secarse, meterse entre el agar y la placa o tener protrusión de vulva, por lo que son censurados. Los muertos y los censurados son retirados de las placas, también se quitan las placas contaminadas.

Tras obtener los datos se aplica Kaplan-Meier y Log Rank por cada par apareado, obteniendo a partir de los programas SPSS y Origin pro8.5 las curvas de mortalidad.

## 2.9 Electrofaringeograma (EFG)

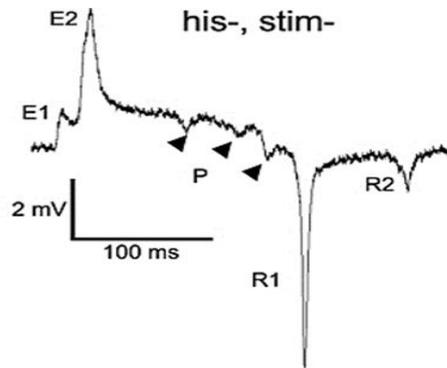
Los *C. elegans* tienen un bombeo faríngeo controlado por motoneuronas y coordinado por ciclos de contracción y relajación. Generan un bombeo durante toda la vida, por lo que se puede decir que la faringe es similar al corazón de vertebrados e invertebrados.

Los *C. elegans* poseen en la faringe, las neuronas MC cuya función es la de actuar como marcapasos y la neurona M3 libera glutamato y facilita la relajación del músculo. Gracias al electrofaringeograma (EFG), realizamos un registro electrofisiológico de la red neuronal de la faringe y obtenemos información de las características del bombeo.(8)

El método utilizado en este trabajo para realizar el EFG fue el Screenchip, formado por una cámara Screenchip con cuyos electrodos externos detecta el cambio de voltaje producido por el intercambio iónico subyacente al potencial de acción de la faringe.

El registro del EFG podemos dividirlo en fases (figura 5):

- Fase E: excitación, que se corresponde con la contracción faríngea.
- Fase P: meseta, producida por potenciales postsináptico inhibitorios.
- Fase R: relajación, asociada a la repolarización.



**Figura 5.** Electrofaringeograma de un *C.elegans* N2. Ondas observadas en el EFG de un *C.elegans* Wild type N2 (Trojanowski et al., 2016).

En los experimentos se han utilizado gusanos adultos D5 (día 5 estadio adulto) DPP1. Por lo que, sincronizamos los gusanos y en D1 se pasan a placas con FuDR, evitando así la contaminación por la progenie.

Tratamos la placa con gusanos DDP1 D5 con 1 ml de tampón más Tween 0.1% (detergente que elimina las posibles bacterias de la comida). Los recogemos con una pipeta pasteur de vidrio en un eppendorf y lo dejamos reposar para que formen un sedimento. Retiramos el sobrenadante y añadimos 1 ml de tampón M9, volteamos 10 veces y lo dejamos reposar hasta que se vuelva a formar un sedimento. Retiramos el sobrenadante y realizamos otros 3 lavados con tampón M9. Posteriormente, retiramos el sobrenadante y añadimos 1 ml de disolución de Serotonina/tampón M9 2.3 mM. La serotonina estimula el bombeo endógeno de la faringe. Volteamos 10 veces, dejamos reposar y decantamos el sobrenadante. Añadimos 1 ml de Serotonina/M9 buffer 2.3 mm y dejamos reposar 15 minutos. Finalmente, introducimos los gusanos en la cámara Screenshot Cartidge de Nemametrix, ayudándonos de una bomba de vacío y la cámara se coloca en un microscopio ZEISS invertido.

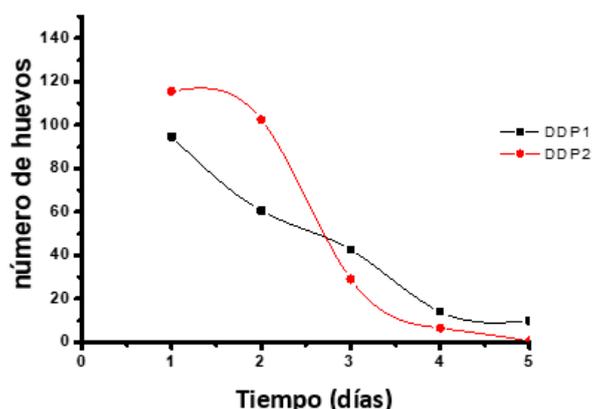
Para realizar el registro de electrofaringeograma, usamos el programa NemAcquire. Se lleva a cabo un registro del bombeo de la faringe en cada gusano, durante 3 minutos. Tendremos en cuenta si el gusano esta de cabeza o de cola en el capilar de la cámara, pues los registros obtenidos cambian.

Para realizar el análisis estadístico de los registros grabados, usamos el programa NemAnalyse, además de guardar los datos en una hoja de Excel para posteriormente realizar el test ANOVA con el programa SPSS.

### 3. Resultados

#### 3.1 Estudios de puesta de huevos y fertilidad

Se llevaron a cabo 3 tandas de estudio de puesta de huevos y fertilidad, según el protocolo descrito en material y métodos, en las cepas DDP1 y DDP2. Se cuenta el número de huevos puestos por cada cepa, se suman y se calcula la media. Se observa que con un número total de 12 gusanos DDP1 el valor promedio de puesta de huevos es de 220,75 y para un total de 18 gusanos DDP2 el valor promedio de la puesta de huevos es de 254,33. No se aprecia gran diferencia en la puesta del número de huevos. Los DDP1 y DDP2 difieren en la velocidad de puesta, siendo más rápida inicialmente en DDP2 que en DDP1 (figura 6) pero en el día 3 baja exponencialmente la puesta de huevos en DDP2, siendo más pausada la bajada en DDP1. Se observa en ambas cepas una fertilidad parecida.



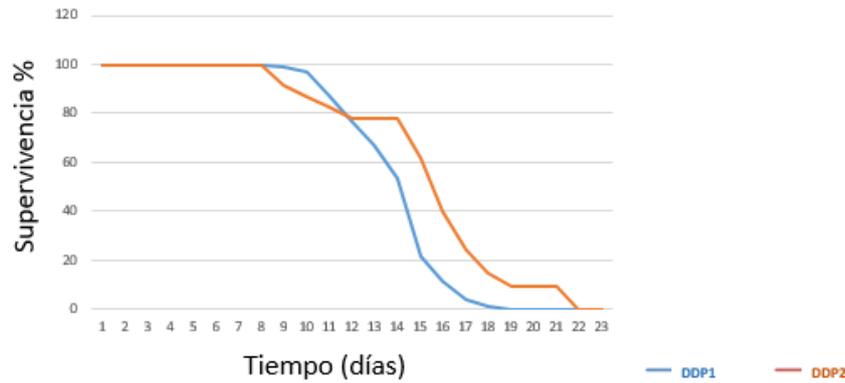
**Figura 6.** Estudio de fertilidad comparativo en cepas DDP1 y DDP2.

No se observa que la expresión de alfa sinucleína en el gusano DDP1 afecte a la puesta de huevos y fertilidad.

#### 3.2 Estudios de mortalidad

Se llevaron a cabo 2 tandas de mortalidad con más de 100 *C. elegans* de cada cepa, y un total de más de 200 gusanos DDP1 y DDP2 (control) estudiados.

En las curvas de mortalidad se puede observar que la cepa DDP1 posee una esperanza de vida claramente menor que los DDP2 con una diferencia significativa. En las dos tandas se obtiene significancia con  $p \leq 0,001$ .



**Figura 7:** Curva de mortalidad comparativa entre DDP1 y DDP2.

En la tabla 1 se presenta la comparación de esperanza de vida de DDP1 y DDP2, control.

Comienzo	DDP1		DDP2		% Descenso tiempo de vida	p-valor	% Descenso medio tiempo de vida
	Vida media en días	Cont./ Total n gusanos	Vida media en días	Cont./ Total n gusanos			
26/10/20	14,2	97/103	15,8	128/151	10,4	<0,001	9,8
16/11/20	15,1	133/136	16,7	118/134	9,3	<0,001	

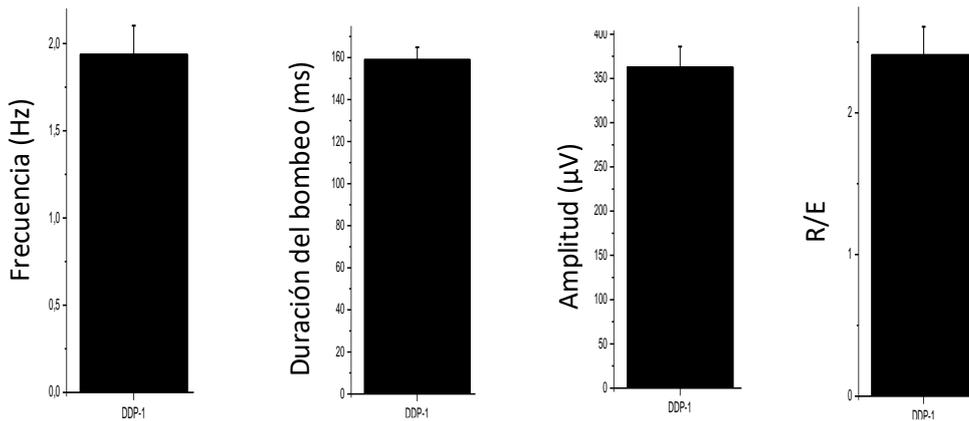
**Tabla 1:** Tabla del estudio estadístico de las mortalidades DDP1 Y DDP2.

Se observa que la expresión de alfa-sinucleína en DDP1 reduce aproximadamente un 10% la esperanza de vida de los gusanos.

### 3.3 Electrofaringeograma

Se realizaron EFG a gusanos adultos D5 DDP1 (n=21).

Se registraron los EFG con el programa NemAnalyse y se estudió la media de la frecuencia, la duración de los bombeos de la faringe, la amplitud y la relación R/E de DDP1 (figura 8). La razón R/E es el cociente entre el pico de repolarización R1 y el pico de despolarización E2 y da información acerca de la excitabilidad.

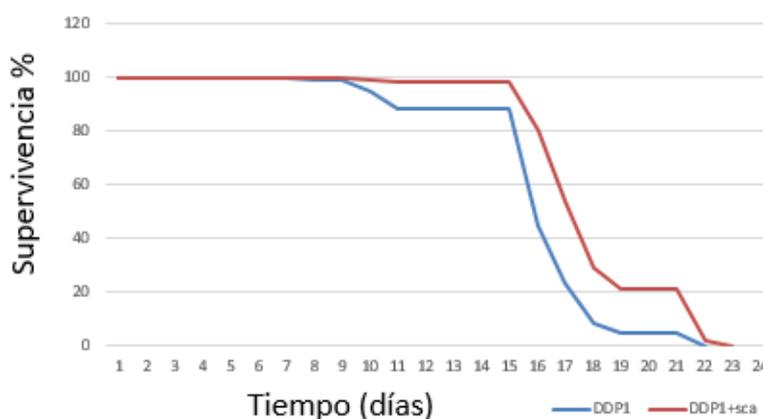


**Figura 8:** Diagrama de barras de las medias de la frecuencia, la duración, de la amplitud de los bombeos de la faringe y el ratio R/E de *C.elegans* DDP1.

Comparando los datos obtenidos en gusanos DDP1 con datos anteriores del laboratorio con gusanos N2, no se observan diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia, en la amplitud del bombeo de la faringe, en la duración del bombeo y en la relación R/E entre DDP1 y N2.

### 3.4 Estudio de la esperanza de vida en gusanos DDP1 con RNAi de *sca-1* 10%.

Se hizo un estudio de mortalidad de gusanos DDP1 con y sin RNA de interferencia de la proteica *sca-1* (más de 100 gusanos por condición). Se utilizó RNAi de la proteína *sca-1* al 10% (RNAi *sca-1* 10% más 90% LR4440).



**Figura 9:** curva de mortalidad comparativa entre DDP1 y DDP1 + *sca-1*.

En la figura 9 se puede observar como la esperanza de vida de los DDP1 + *sca-1* aumenta y es similar a los controles con la cepa DDP2 (Ver figura 7), con lo que el RNAi de *sca-1* es capaz de revertir la mortalidad por alfa-sinucleína en los *C. elegans* DDP1.

Comienzo	DDP1		DDP1+sca-1 10%		Aumento del % esperanza de vida	p-valor
	Vida media en días	Cont./ Total n gusanos	Vida media en días	Cont./ Total n gusanos		
12/04/21	16.566	138/152	18,363	139/149	9,785	<0,001

**Tabla 2:** Tabla del estudio estadístico de las mortalidades en *ddp1* con y sin *sca-1*.

Se observa que el RNA de interferencia *sca-1* aumenta un 10% la esperanza de vida en los DDP1.

#### 4. Discusión

El modelo animal utilizado para el estudio *in vivo* de la enfermedad de Parkinson es *C. elegans*, debido a que presenta numerosas ventajas como animal de laboratorio.

La cepa DDP1 de *C. elegans*, objeto de este trabajo, sobre-expresa la proteína alfa-sinucleína que es la responsable de las alteraciones neuronales en la enfermedad de Parkinson.

A lo largo del trabajo se han ido realizando diferentes experimentos propuestos en los objetivos con el fin de poder estudiar los efectos que la sobreexpresión de alfa-sinucleína tiene en *C. elegans*, y conseguir así, una aproximación a la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.

Se ha encontrado que la cepa DDP1 posee una esperanza de vida significativamente menor a la cepa control, DDP2, de un 10%.

En los estudios llevados a cabo en el electrofaringeograma en DDP1 se ha observado que los EFG de DDP1 son muy similares a los EFG de N2, obtenidos previamente en el laboratorio. Por tanto comparando los EFG de DDP1 y N2 no observamos diferencias.

Posteriormente, se ha estudiado la esperanza de vida en DDP1 silenciando un 10% la expresión de la proteína *sca-1* mediante la adición de RNA de interferencia. En este caso hemos visto que los DDP1 tratados con RNAi de *sca-1* aumentan su esperanza de vida, igualando en el porcentaje a la obtenida con el control DDP2.

## 5. Conclusiones

1. La esperanza de vida de los *C. elegans* DDP1, que expresan alfa-sinucleína, es significativamente menor que su cepa control DDP2, un 10% menos.
2. La expresión de alfa-sinucleína no afecta ni a la puesta de huevos ni a la fertilidad.
3. En el estudio de los EFG de DDP1 no se observa diferencias en la frecuencia, la amplitud, la duración del bombeo, la relación R/E, comparando con datos obtenidos previamente en el laboratorio en gusanos N2.
4. La esperanza de vida de los *C. elegans* DDP1 a los que se les ha añadido RNAi de *sca-1* es un 10% mayor que los DDP1 y es similar a la cepa control de DDP2, por lo que se puede afirmar que revierte la mortalidad inducida por alfa-sinucleína en DDP1.

Son necesarios más experimentos para saber cómo y por qué el RNA de interferencia de la proteína *sca-1* es capaz de revertir la esperanza de vida en los gusanos DDP1. Pero con este trabajo experimental de fin de grado se ha realizado el estudio básico inicial a partir del cual entender la fisiopatología de la agregación de alfa-sinucleína y la posible reversión por RNAi de *sca-1* en el modelo animal *C.elegans*.

## Bibliografía

1. Maulik M, Mitra S, Bult-Ito A, Taylor BE, Vayndorf EM. Behavioral Phenotyping and Pathological Indicators of Parkinson's Disease in *C. elegans* Models [Internet]. Vol. 8, *Frontiers in Genetics* . 2017. p. 77. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2017.00077>
2. van Ham TJ, Thijssen KL, Breitling R, Hofstra RMW, Plasterk RHA, Nollen EAA. *C. elegans* model identifies genetic modifiers of alpha-synuclein inclusion formation during aging. *PLoS Genet* [Internet]. 2008 Mar 21;4(3):e1000027–e1000027. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18369446>
3. Wu S, Lei L, Song Y, Liu M, Lu S, Lou D, et al. Mutation of hop-1 and pink-1 attenuates vulnerability of neurotoxicity in *C. elegans*: the role of mitochondria-associated membrane proteins in Parkinsonism. *Exp Neurol*. 2018 Aug 1;309.
4. Malaiwong N, Chalorak P, Jattujan P, Manohong P, Niamnont N, Suphamungmee W, et al. Anti-Parkinson activity of bioactive substances extracted from *Holothuria leucospilota*. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;109:1967–77. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218363923>
5. Schmidt E, Seifert M, Baumeister R. *Caenorhabditis elegans* as a Model System for Parkinson's Disease. *Neurodegener Dis* [Internet]. 2007;4(2–3):199–217. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000101845>
6. Bodhicharla R, Nagarajan A, Winter J, Adenle A, Nazir A, Brady D, et al. Effects of  $\alpha$ -synuclein overexpression in transgenic *Caenorhabditis elegans* strains. *CNS Neurol Disord Drug Targets* [Internet]. 2012 Dec;11(8):965–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23244416>
7. Rosenbluth R, Cuddeford C, Baillie D. Mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. II. A spectrum of mutational events induced with 1500 R of gamma-radiation. *Genetics*. 1985 Apr 1;109:493–511.
8. Calahorro F, Keefe F, Dillon J, Holden-Dye L, O'Connor V. Neuroligin tuning of pharyngeal pumping reveals extrapharyngeal modulation of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol* [Internet]. 2019 Feb 8;222(3). Available from: <https://doi.org/10.1242/jeb.189423>

## ANEXO I

### Reactivos

- 10 % Tween20.
- Agar.
- Clorhidrato de serotonina.
- Cloruro de calcio.
- Cloruro sódico.
- Colesterol.
- FuDR 5'-fluoro-2'-deoxiuridina.
- Hidróxido de sodio.
- Peptona bacteriológica.
- Sulfato de magnesio.
- Tampón M9:
  - Cloruro sódico.
  - Fosfato monopotásico.
  - Fosfato disódico.
  - Sulfato de magnesio.
- Tampón M9  $K^2HPO^4/KH^2PO^4$ 
  - Fosfato de hidrogeno dipotásico.
  - Fosfato monopotásico.

## ANEXO II

### Composición del tampón M9:

REACTIVO	CANTIDAD
$KH_2PO_4$	3 g
$Na_2HPO_4$	6 g
NaCl	5 g
$MgSO_4$ 1M	1 ml
$H_2O$	Añadir a 1 L

### Enlace al video:

<https://www.kaltura.com/tiny/zgctj>

Autor: Sara Ruiz Serrano

Tutoras: Pilar Álvarez-Illera  
Mayte Montero Zoccola

### INTRODUCCIÓN

- La enfermedad de Parkinson destaca por empeorar progresivamente con la edad, clasificándose dentro de los trastornos neurodegenerativos y caracterizada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas particularmente en la sustancia negra y la agregación de alfa-sinucleína intracelular, histológicamente denominada cuerpo de Lewy.
- El *C. elegans*, es un modelo no mamífero e invertebrado útil para comprender los mecanismos moleculares de distintas enfermedades como la enfermedad de Parkinson, así como el estudio del envejecimiento neuronal y síntomas celulares de esta enfermedad.
- El RNA de interferencia es una molécula bicatenaria de RNA que impide la expresión de genes específicos, de forma selectiva y precisa.
- En este trabajo hemos utilizado el RNAi de la proteína *sca-1*, en *C. elegans*, que se expresa en el retículo-sarco-endoplásmico de las células del gusano, con el fin de estudiar si esta proteína *sca-1* que transporta  $Ca^{2+}$  al interior del retículo-sarco-endoplásmico, estuviera implicada en los efectos de la agrupación de alfa-sinucleína.

### OBJETIVOS

- Objetivo general:** estudiar los efectos de la alfa-sinucleína en *C. elegans* DDP1, causante de la enfermedad de Parkinson en humanos, comparada con la cepa DDP2, que no expresa alfa-sinucleína.
  - Estudios de fertilidad.
  - Determinación de la esperanza de vida.
  - Estudio del bombeo de la faringe por EFG.
  - Estudio de la esperanza de vida en gusanos DDP1 con RNAi de *sca-1*.

### METODOLOGÍA

- Cepas:** DDP1 expresa alfa-sinucleína y DDP2 es el control de DDP1 que expresa un plásmido vacío.
- Mantenimiento:** los *C. elegans* crecen a 20°C en placas de agar sembradas con *E. Coli* OP50.
- Puesta de huevos y fertilidad:** Se pone 1 gusano L4 por placa (total de 5 placas), ese individuo se pasa diariamente a placas nuevas y cada día contamos las larvas nuevas y lo anotamos en una tabla. Se realiza el experimento en paralelo con ambas líneas DDP1 y DDP2.
- Mortalidad:** Se ponen 15 gusanos DDP1 o DDP2 de D1 por placa y preparamos 10 placas de mortalidad, con un total de 150 gusanos por cepa. Se cuentan con lupa todos los días hasta que muera el último. Anotando todo en una plantilla.
- Electrofaringeograma:** El método utilizado fue el Screenchip, en el que los electrodos externos detectan el cambio de voltaje producido por el intercambio iónico subyacente al potencial de acción de la faringe. En gusanos DDP1 de D5 se estudió la frecuencia, la duración del bombeo, la amplitud y el ratio R/E.

### CONCLUSIONES

- La esperanza de vida de los *C. elegans* DDP1, que expresan que alfa-sinucleína, es significativamente menor que su cepa control DDP2, del orden de un 10% menos.
- La expresión de alfa-sinucleína no afecta ni a la puesta de huevos ni a la fertilidad.
- En el estudio del EFG de los DDP1 no se observan diferencias en la frecuencia, la amplitud, la duración del bombeo, la relación R/E, comparado con datos obtenidos previamente en el laboratorio en gusanos N2.
- La esperanza de vida de los *C. elegans* DDP1 a los que se les ha añadido RNAi de *sca-1*, es un 10% mayor que los DDP1 y es similar a la cepa control de DDP2, por lo que se puede afirmar que RNAi de *sca-1* revierte la mortalidad inducida por alfa-sinucleína en gusanos DDP1.

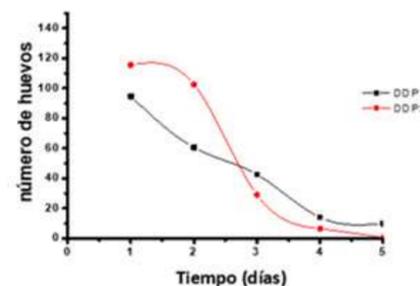
Son necesarios más estudios para saber cómo y por qué el RNA de interferencia de la proteína *sca-1* (Sarco-endo-plasmic reticulum Calcium ATPase) es capaz de revertir la esperanza de vida en los gusanos DDP1. Pero en este trabajo experimental de fin de grado, se ha realizado el estudio básico inicial a partir del cual entender la fisiopatología de la alfa-sinucleína (Parkinson) y la posible reversión por RNAi.

### BIBLIOGRAFÍA

Ver memoria del trabajo.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

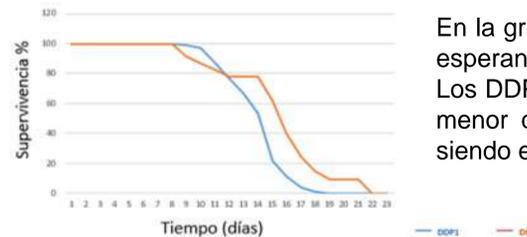
#### Estudios de puesta de huevos y fertilidad:



Estudio de fertilidad comparativo en cepas DDP1 y DDP2.

No se observa que la expresión de la alfa-sinucleína en el gusano afecte a la puesta de huevos y fertilidad.

#### Estudios de mortalidad:



Curva de mortalidad comparativa entre DDP1 y DDP2.

En la gráfica se observa una comparativa de la esperanza de vida de las cepas DDP1 y DDP2. Los DDP1 tienen una esperanza de vida media menor que los DDP2, del orden de un 10%, siendo estadísticamente significativo.

Comienzo	DDP1		DDP2		% Descenso tiempo de vida	p-valor	% Descenso medio tiempo de vida
	Vida media en días	Cont./ Total n gusanos	Vida media en días	Cont./ Total n gusanos			
26/10/20	14,2	97/103	15,8	128/151	10,4	<0,001	9,8
16/11/20	15,1	133/136	16,7	118/134	9,3	<0,001	

Tabla del estudio estadístico de las mortalidades de DDP1 y DDP2.

- Electrofaringeograma:** Se realizaron con el programa NemAnalyse registros de EFG y se estudió la media de frecuencia, duración de bombeo de la faringe, amplitud y relación R/E de *C. elegans* DDP1.

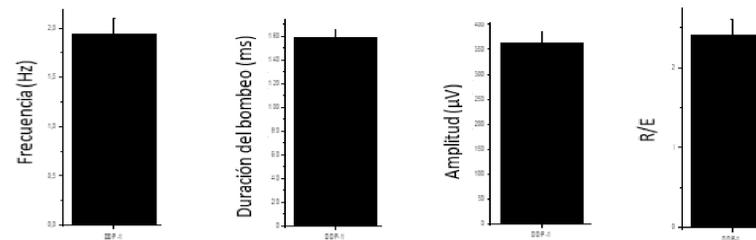
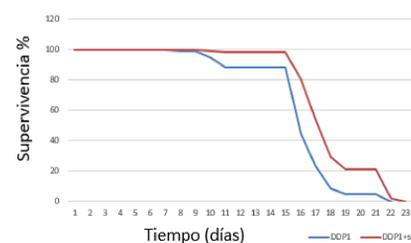


Diagrama de barras de las medias de la frecuencia, la duración, de la amplitud de los bombeos de la faringe y el ratio R/E de *C. elegans* DDP1.

Comparando con datos previos del laboratorio en gusanos N2, no se observan diferencias estadísticamente significativas en frecuencia, en duración del bombeo, en amplitud del bombeo de la faringe y en la relación R/E, entre DDP1 y N2.

#### Estudio de la esperanza de vida en gusanos DDP1 con RNAi de *sca-1* 10%:



curva de mortalidad comparativa entre DDP1 y DDP1 + *sca-1*.

En este estudio se muestra como la esperanza de vida de los DDP1 + *sca-1* aumenta y es similar a los controles con la cepa DDP2, esto indica que el RNAi de *sca-1* es capaz de revertir el efecto de la alfa-sinucleína en los *C. elegans* DDP1, en relación a la esperanza de vida.

Comienzo	DDP1		DDP1+sca-1 10%		Aumento del % esperanza de vida	p-valor
	Vida media en días	Cont./ Total n gusanos	Vida media en días	Cont./ Total n gusanos		
12/04/21	16,566	138/152	18,363	139/149	9,785	<0,001

El RNAi de *sca-1* en DDP1 aumenta en un 10% la esperanza de vida media comparado con DDP1 y similar a la vida media de los DDP2.